



**TRABAJO DE FIN DE GRADO  
GRADO EN FARMACIA**

Título: EXOSOMAS, APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL Y  
APLICACIONES CLÍNICAS.

Autor: BOHDAN BABIY

Tutor: MARÍA JOSÉ CARMENA SIERRA

Curso: 2015-2016

## **AUTORIZACIÓN E INFORME PARA LA DEFENSA PÚBLICA DEL TRABAJO DE FIN DE GRADO**

(Segunda Página de Memoria del Trabajo Fin de Grado)

D<sup>a</sup> María José Carmena Sierra  
Profesora del Departamento de Biología de Sistemas  
como tutora del Trabajo de Fin de Grado en Farmacia de  
D Bohdan Babiy

Titulado: Exosomas, aproximación experimental y aplicaciones clínicas.

INFORMA: Que ha sido realizado y redactado por el mencionado alumno bajo  
mi dirección y con esta fecha autorizo a su presentación y defensa pública

Alcalá de Henares 28 de junio de 2016

Fdo.: María José Carmena Sierra



## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| 1. Resumen.....  | 1  |
| 2. Introducción.....   | 2  |
| 2.1. Vesículas extracelulares. Características generales de los exosomas.....      | 2  |
| 2.2. Fuentes de exosomas. Funciones.....   | 3  |
| 2.3. Biogénesis.....   | 4  |
| 2.4. Estructura de los exosomas.....   | 6  |
| 2.5. Mecanismos de captura.....  | 8  |
| 2.6. Técnicas de aislamiento y de análisis de los exosomas.....                    | 9  |
| 2.7. Técnicas de introducción de fármacos.....                                     | 10 |
| 3. Objetivos.....  | 11 |
| 4. Materiales y métodos.....   | 11 |
| 4.1. Materiales y métodos para el estudio bibliográfico:.....                      | 11 |
| 4.2. Materiales y métodos para el estudio experimental:.....                       | 11 |
| 4.2.2. Cultivos celulares.....   | 12 |
| 4.2.3. Aislamiento de exosomas.....  | 12 |
| 4.2.4. Determinación de la concentración de proteínas por el método Bradford... .. | 13 |
| 4.2.5. “Western blot”.....   | 14 |
| 5. Resultados.....   | 15 |
| 5.1. Cultivo y aislamiento de exosomas.....  | 15 |
| 5.2. Determinación de la concentración de proteínas por el método de Bradford....  | 16 |
| 5.3. Identificación de exosomas por “Western Blot”.....                            | 16 |
| 5.4. Revisión bibliográfica de la encapsulación de doxorubicina en exosomas.....   | 17 |
| 6. Conclusión.....   | 21 |
| 7. Bibliografía.....   | 23 |

## 1. RESUMEN.

### 1.1. RESUMEN EN ESPAÑOL.

En este trabajo vamos a reflejar algunos de los avances fundamentales en el campo de la comunicación intercelular de los últimos años relacionados con las vesículas extracelulares y, en especial, con los exosomas que han supuesto un cambio en el concepto de las funciones y el papel que desempeñan éstas vesículas en los organismos vivos. Se ha realizado una aproximación experimental sobre las técnicas básicas de separación e identificación de exosomas y una revisión bibliográfica de la metodología de introducción de fármacos en exosomas. Con el fin de reflejar las aplicaciones clínicas más relevantes se ha realizado una revisión de los estudios de encapsulación de doxorubicina en exosomas que ponen de manifiesto la disminución de los efectos adversos respecto a la administración de fármaco libre y la necesidad de mejorar su semivida plasmática.

**Palabras clave:** exosomas, vesículas extracelulares, doxorubicina, transporte de medicamentos, nanopartículas.

### 1.2. RESUMEN EN INGLÉS.

In this work we will reflect some fundamental advances in the field of intercellular communication in recent years related to the extracellular vesicles and, in particular, to exosomes that have meant a change in the concept of the functions and the role played by these vesicles in living organisms. We took on an experimental approach on the basic techniques of separation and identification of the exosomes and a literature review of the methodology for introduction of drugs in exosomes. In order to reflect the most relevant clinical applications it's been carried out a review of the studies of encapsulation of doxorubicin in exosomes that revealed the reduction of the adverse effects in contrast to the administration of free drug and the need to improve its half-life in plasma.

**Keywords:** exosomes, extracellular vesicles, doxorubicin, drug delivery, nanoparticles.

## 2. INTRODUCCIÓN.

### 2.1. VESÍCULAS EXTRACELULARES. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS EXOSOMAS.

El concepto de vesículas extracelulares abarca un grupo de estructuras muy heterogéneas tanto por su tamaño y forma como por su contenido y las funciones que desempeñan. Generalmente se distinguen tres tipos de vesículas extracelulares: cuerpos apoptóticos, microvesículas y exosomas. Los cuerpos apoptóticos y las microvesículas, cuyo diámetro puede variar entre 150-1000 nm y 50-2000 nm respectivamente, representan la parte más conocida de las vesículas extracelulares que se describen como una forma de transporte del contenido intracelular destinado al reciclaje de los productos de desecho. Los exosomas son el grupo de vesículas de más reciente descubrimiento. Fueron descritas por primera vez por Trams y col. en el año 1981 [11] y posteriormente Johnstone y col. en el año 1983 [11] acuñaron su nombre y desarrollan el concepto en profundidad. A diferencia del resto de las vesículas extracelulares, **los exosomas están directamente implicados en la comunicación intercelular** y están ganando protagonismo en todo tipo de procesos tanto fisiológicos como patológicos.

Los exosomas son vesículas constituidas por una bicapa lipídica con un diámetro entre 40-120 nm y una densidad entre 1,15-1,19 g/ml [19] que han sido detectadas en la mayoría de los líquidos biológicos incluyendo sangre, orina, líquido cefalorraquídeo, linfa, líquido sinovial, leche materna, saliva, etc. [18] y cuya principal característica es su función como mensajeros intercelulares. Son un grupo de vesículas muy diverso en la composición de su bicapa lipídica y en su contenido, lo que les confiere una alta selectividad de interacción con la célula diana y capacidad de modificación del metabolismo celular gracias a las proteínas y los ácidos nucleicos que transportan, sobre todo mediante los mRNAs y los miRNAs. Como resultado de su **alta selectividad y su capacidad de llevar mensajes entre distintos tipos celulares, junto con su pequeño diámetro y su baja inmunogenicidad** se ha convertido en objeto de estudio como agentes terapéuticos en enfermedades neurodegenerativas y carcinomas o como posibles **vectores endógenos para el transporte de medicamentos**.

## 2.2. FUENTES DE EXOSOMAS. FUNCIONES.

**Se han aislado exosomas de distintos tipos celulares** incluyendo células dendríticas, macrófagos, células B, células T, células madre estromales (MSC), plaquetas, reticulocitos, neuronas, oligodendrocitos, células endoteliales, células del epitelio y células tumorales. De todos ellos, los más estudiados actualmente son los exosomas derivados de las células del sistema inmunitario y de células tumorales.

Los exosomas aislados de células tumorales tienen la capacidad de promover la oncogénesis de células sanas y participar en la metástasis del tumor; tienen capacidad de provocar inmunosupresión induciendo apoptosis de las células T o regulando la expresión de los receptores del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) e incluso actúan como un mecanismo de quimiorresistencia [18].

Las células presentadoras de antígenos forman exosomas que en su superficie presentan receptores para MHC I y II y moléculas coestimuladoras de células T gracias a lo cual pueden actuar como transportadores de antígenos y promover tanto la respuesta inmune específica como la innata [3].

En cuanto a las funciones que desempeñan en otros tipos celulares, es de destacar que los exosomas procedentes de oligodendrocitos favorecen la remielinización de las neuronas del Sistema Nervioso Central. El mRNA transportado por los exosomas derivados de macrófagos puede actuar inhibiendo la proliferación del carcinoma hepático. Los exosomas derivados de células endoteliales pueden actuar previniendo la aterosclerosis y las lesiones arteriales. Las células madre estromales (MSC), especialmente importantes por su capacidad de generar grandes cantidades de exosomas con actividad protectora y regeneradora, han sido utilizados en múltiples estudios como agente terapéutico en casos de isquemia miocárdica, hipertensión y fibrosis pulmonar, para promover regeneración hepática y en casos de hemorragia cerebral demostrando tener un efecto neuroprotector [11,2,10].

Por lo tanto, las funciones que realizan los exosomas son muy variadas y **dependen de muchos factores como el tipo de célula progenitora, el contenido de los exosomas y el estado fisiológico de la célula** en el momento de la

excreción, pero todas se basan en una actividad básica que es la capacidad de transmitir señales entre las células distantes.

El campo de investigación de los exosomas se extiende a todo tipo de células. Así se han aislado los exosomas producidos, aparte de otros tipos de mamíferos, de organismos vivos como bacterias Gram - y Gram +, hongos, levaduras, parásitos unicelulares, nematodos, plantas y mosquitos [10,13]. Estas **fuentes alternativas** de exosomas presentan mucho interés por los efectos que pueden tener como agentes terapéuticos, aunque también pueden ser de **utilidad en la búsqueda de fuentes sostenibles de exosomas y para escalar la producción**. Actualmente se han publicado varios estudios que investigan las microvesículas tipo exosomas presentes en el jugo de pomelo [25] o del jugo de limón [16]. También hay varios estudios de exosomas derivados de leche bovina que presentan un especial interés para transporte de agentes terapéuticos o su utilización como potencial fuente de producción de los exosomas [1].

### 2.3. BIOGÉNESIS.

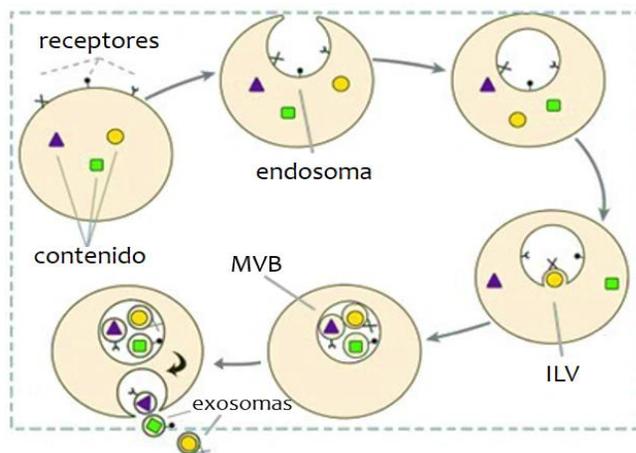
Las vías de biogénesis de los exosomas no han sido descritas en su totalidad por el momento, pero la información disponible nos revela algunos mecanismos generales de su formación presentando ciertas similitudes con el mecanismo de formación de las vesículas lisosomales. Así la formación de los exosomas se produce **dentro del compartimento endosomal** de la célula, a diferencia de otras vesículas extracelulares que se forman por invaginación directa de la membrana plasmática.

El compartimento endosomal es un sistema de vesículas formado por invaginación de la membrana plasmática (**Figura 1.a**) y posterior maduración que conlleva cambios en su composición y formación de unas vesículas intraluminales (ILV) en su membrana limitante (**Figura 1.b**) pasando en este momento a denominarse cuerpos multivesiculares (MVB). La formación de ILV se produce mediante invaginación de la membrana endosomal y gracias a la maquinaria del complejo de ordenación endosomal necesario para el transporte (ESCRT) [18] que junto con las moléculas complementarias como Alix, VPS4 y tetraspaninas [1], detectadas posteriormente en la membrana de los exosomas, seleccionan

determinadas proteínas y ácidos nucleicos para su introducción en el interior de las vesículas. Una vez liberadas al espacio extracelular las ILV se convierten en los exosomas (**Figura 1.c**) [11,18,1].

A pesar de la complejidad de la biogénesis, con el tiempo se va descubriendo más información acerca de los procesos y condiciones en que transcurre. En uno de los estudios se ha visto que para que se formen los MVB y, por tanto, los exosomas, es necesaria la presencia de algunos factores como fosfatidilinositol-3 quinasa. De la misma manera, en función de las características de la membrana, como su riqueza en colesterol o la presencia del receptor para el factor de crecimiento, se decide si los exosomas se van a destinar a la degradación en los lisosomas o se van a liberar al espacio extracelular mediante fusión con la membrana plasmática [1]. Dentro de los ejemplos de biogénesis que han sido descritos destaca la formación de exosomas en ausencia del complejo ESCRT o de la esfingomielinasa; pudiendo darse incluso en ausencia de ambos factores [11,1,7]. También se ha descrito el aumento de la producción de exosomas en condiciones de choque térmico lo cual influye en sus características y actividad [27].

La **biogénesis**, por tanto, es un **proceso muy complejo** donde la liberación de exosomas **depende de muchos factores** como el medio externo o el estado de la célula y que se ve aumentada por la **existencia de vías secundarias de formación** que se activan en presencia o ausencia de diversos factores.

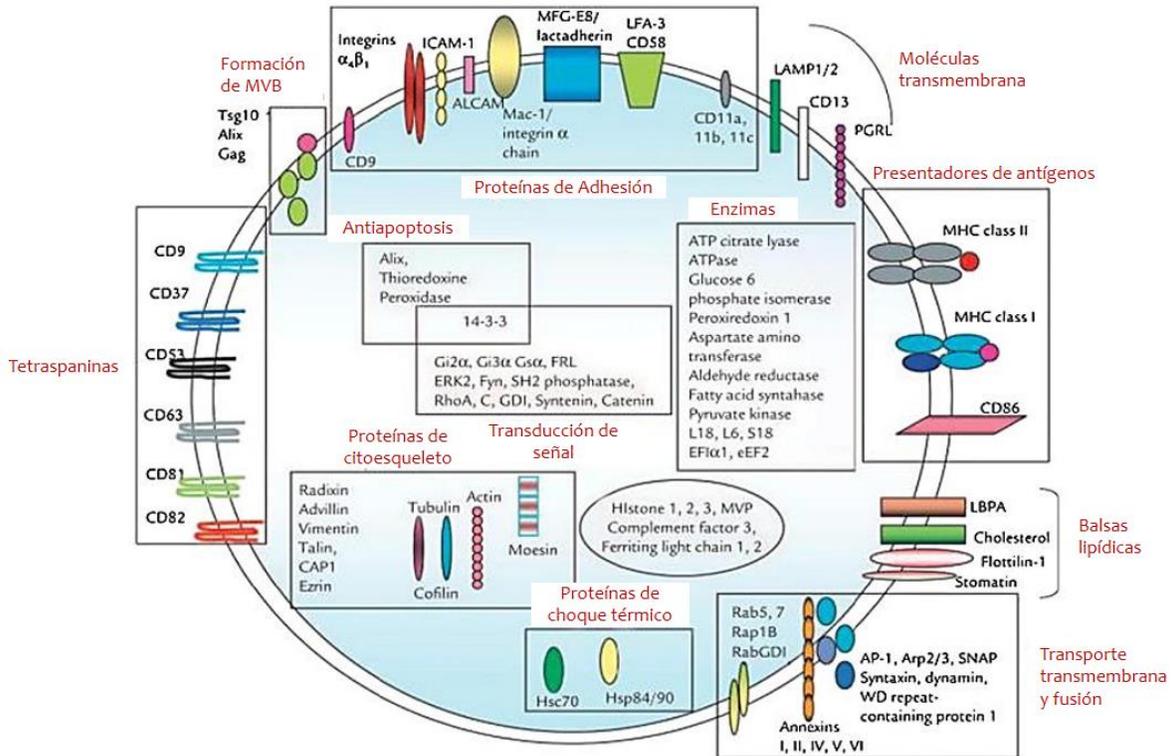


**Figura 1.** Mecanismo general de la biogénesis de los exosomas. (Modificado de Aryani y col., 2016: [1]).

#### 2.4. ESTRUCTURA DE LOS EXOSOMAS.

La estructura de los exosomas está estrechamente relacionada con sus propiedades y se suele dividir en dos partes, la membrana lipídica y el contenido.

La **composición de la membrana lipídica** es responsable de las características como la **baja inmunogenicidad y toxicidad de los exosomas, la selectividad de acción, la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica y la estabilidad en el torrente sanguíneo** fundamentales para desempeñar sus funciones. Como resultado del mecanismo de la génesis de los exosomas, su bicapa lipídica en su mayor parte procede de la membrana plasmática de la célula progenitora presentando, al mismo tiempo, características distintivas como la presencia o ausencia de ciertas proteínas, ligandos y moléculas de adhesión específicas que inducen a pensar en la existencia de vías de selección propias de los exosomas responsables de estas variaciones. Según estudios publicados en los últimos años se ha detectado una serie de características comunes en cuanto a la composición de la membrana de los exosomas. Son unas vesículas constituidas por una bicapa lipídica enriquecida en colesterol, esfingomielinina, fosfatidilserina y ácidos grasos saturados o monoinsaturados a expensas de fosfatidilcolina y etanolamina lo que les confiere una alta estabilidad en circulación [3]. También se han detectado algunas proteínas características como las de la familia de las tetraspaninas (CD9, CD61, CD63, CD81, CD82, CD18, CD11b y CD169, esta última implicada en su captura por los macrófagos [17]); Alix, VPS4 y TSG (10 y 101) implicadas en la génesis de los exosomas, la proteína transmembrana asociada a los lisosomas Lamp2b; las moléculas de fusión o transporte transmembrana de la familia de Annexinas (I, II, IV, V, VI), proteínas Rab (5, 7, 11, 27, 35) y Flotilina [11,1,23] y las moléculas de adhesión celular de la familia CAM y lactadherina (MFG-E8), junto con otras proteínas que inhiben la fagocitosis o el sistema de complemento retrasando su eliminación de la sangre [10] (**Figura 2**). Algunas de ellas se utilizan en investigación como marcadores de la presencia de exosomas como las **tetraspaninas** CD9, CD63 y CD81, Alix, TG101 o proteína transmembrana lisosomal Lamp2, entre otras.



**Figura 2.** Composición, localización y funciones de proteínas en los exosomas. ALCAM – molécula activada de adhesión a células leucotarias, ATP – adenosin trifosfato, GDI – inhibidor de disociación de guanosa trifosfato, ICAM-1 – molécula 1 de adhesión intercelular, MHC – complejo mayor de histocompatibilidad. (Modificado de Tran y col., 2015; [14]).

Por otro lado, el contenido de los exosomas y su capacidad de transportarlo a larga distancia de forma estable ha sido una de las características que han generado un gran interés en la comunidad científica para su posterior investigación como potenciales vectores endógenos de transmisión de agentes terapéuticos. En este caso, el contenido de los exosomas guarda similitudes con el citosol de la célula progenitora con variaciones en cuanto a las proteínas y los ácidos nucleicos que constituyen el mensaje transportado. Así, por ejemplo, en los exosomas derivados de las plaquetas y células del sistema mononuclear se ha detectado mRNA con composición distinta a los detectados en sus células parentales. Como resultado se han creado **bases de datos en línea** como <http://www.microvesicles.org/> o <http://www.exocarta.org/> donde se ha identificado **más de 11.000 proteínas [11] transportadas en los exosomas junto con los ácidos nucleicos** en forma de shRNA, siRNA, mRNA y sobre todo miRNAs aunque los mecanismos responsables del proceso de selección siguen siendo desconocidos. Algunos estudios indican que

puede estar relacionado con la actividad del complejo ESCRT, con la afinidad por los lípidos o las proteínas de la membrana o con la incorporación al complejo proteico resistente a los detergentes [1].

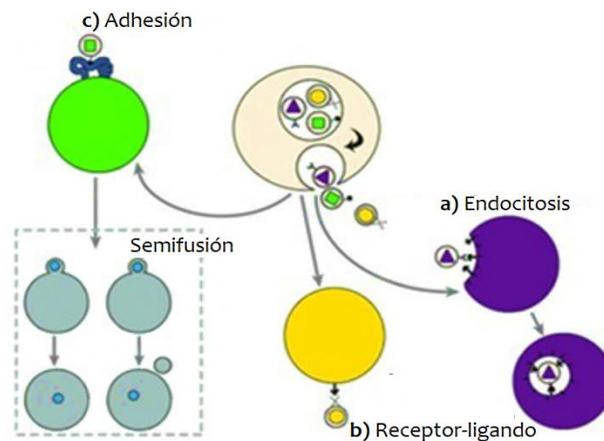
#### 2.5.MECANISMOS DE CAPTURA.

Una condición fundamental para que los exosomas ejerzan su acción es que se fusionen total o parcialmente con las células diana. Se conocen tres formas generales de captura de exosomas:

- a) Endocitosis es la más común distinguiéndose dependiente de clatrina, de caveolas, por fagocitosis, micropinocitosis o mediado por balsas lipídicas (“lipid-rafts”) [15];
- b) Interacción de tipo receptor-ligando como la que ocurre en el caso de la presentación de antígenos o interacción con receptores de complemento [10];
- c) Adhesión mediada por proteínas de la familia integrinas o tetraspaninas [15].

También se ha descrito un mecanismo de adhesión seguido por una semifusión de los exosomas con la membrana celular suficiente para transferir su contenido [1] liberándose después la bicapa lipídica (**Figura 3**).

**El proceso de captura puede verse modificado en función de las condiciones del medio o de la célula diana** de modo que, por ejemplo, las condiciones ácidas características del medio de los tejidos tumorales promueven la absorción de los exosomas. El estado inmaduro de las células dendríticas se traduce en una mayor capacidad de absorción de los exosomas comparando con las células maduras [1]. También se ha visto que la presencia de glucosaminoglucanos como heparansulfato o fosfatidilserina en la superficie de los exosomas es fundamental para su captura y fusión con las células diana [3].



**Figura 3.** Mecanismos de absorción de los exosomas. (Modificado de Aryani y col., 2016; [1]).

## 2.6. TÉCNICAS DE AISLAMIENTO Y DE ANÁLISIS DE LOS EXOSOMAS.

Las **técnicas de aislamiento** de los exosomas más frecuentemente utilizadas en los estudios realizados en el laboratorio están **basados en la separación por ultracentrifugación** [19,23] de la muestra con el fin de precipitar restos celulares y otras interferencias del medio.

Uno de los inconvenientes de la ultracentrifugación es la **presencia de agregados proteicos en el pellet final**. Para mejorar los resultados de la purificación, se puede recurrir al **uso de gradientes de sacarosa** para separar los exosomas por su densidad característica.

Otro método de **aislamiento rápido y eficaz** está basado en la **inmunocaptura** de los exosomas en la superficie de unas bolitas magnéticas recubiertas con anticuerpos frente a una de las proteínas expresadas en la superficie de los exosomas lo que permite un fácil manejo de los exosomas.

Las técnicas usadas normalmente para la **caracterización e identificación de exosomas** consisten en el estudio morfológico mediante microscopía electrónica y en la inmunodetección con anticuerpos específicos de proteínas características de los exosomas ("**Western Blot**"). También se pueden estudiar sus características aplicando citometría de flujo sobre los exosomas fijados en las bolitas de inmunocaptura; ya que debido al pequeño tamaño de los exosomas libres, no es posible analizarlos [19].

## 2.7. TÉCNICAS DE INTRODUCCIÓN DE FÁRMACOS.

Las técnicas de introducción de los fármacos en el interior de los exosomas se pueden diferenciar en dos grupos, las que se realizan *in vitro* en las células o *ex vivo* con los exosomas purificado.

Dentro de los métodos *in vitro* se pueden diferenciar tres tipos consistentes en:

- La modificación genética de las células para sobreexpresar la proteína de interés aumentando así su concentración en el citoplasma y favoreciendo su introducción en los exosomas de forma pasiva.
- La modificación de la expresión de las proteínas características de los exosomas, como lactadherina o Lamp2b, mediante la fusión con las proteínas de interés promoviendo de este modo su introducción en las vesículas.
- La modificación de proteínas o ácidos nucleicos de interés como la N-miristoilación de proteínas, de modo que se unan con los dominios expresados en la superficie de los exosomas [3,10].

También se ha visto que algunos virus, como el adenovirus (AAV) o el virus de la hepatitis A, transmiten sus partículas mediante exosomas. Debido a ello, pueden ser utilizados como vectores en terapia génica [10].

Los métodos *ex vivo* más utilizados son la electroporación y la incubación directa. La **electroporación** consiste en la aplicación de una corriente eléctrica a los exosomas purificados con el fin de aumentar la porosidad de la membrana plasmática y favorecer así la introducción de las moléculas en disolución. Se recomienda utilizar un medio de trehalosa pulsátil para disminuir la probabilidad de agregación de las moléculas, sobre todo es de interés para la introducción de **moléculas de pequeño tamaño como miRNA o siRNA**. Sin embargo, la **incubación directa** promueve la introducción de **moléculas lipófilas de pequeño tamaño** al interior de los exosomas de manera pasiva [10].

### 3. OBJETIVOS.

En este trabajo nos hemos planteado dos objetivos muy diferentes:

1. Una aproximación experimental al estudio en el laboratorio de los exosomas extraídos del medio extracelular de los cultivos de células PC3.
2. Una revisión bibliográfica de la aplicación clínica de los exosomas como vehículos biológicos de fármacos. Se ha elegido la doxorrubicina como fármaco para el estudio.

### 4. MATERIALES Y MÉTODOS.

#### 4.1. MATERIALES Y MÉTODOS PARA EL ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO:

Revisión bibliográfica sistematizada de artículos científicos, de acceso libre o restringido utilizando la red de la universidad UAH, consultando las bases de datos PubMed y EuropePMC, sin restricciones de fecha, en inglés y español. Se han revisado los resúmenes de artículos, en los casos necesarios artículos completos, la bibliografía citada y artículos relacionados.

#### 4.2. MATERIALES Y MÉTODOS PARA EL ESTUDIO EXPERIMENTAL:

##### 4.2.1. MATERIALES.

- Flask de cultivo, pipetas esterilizadas, equipo de electroforesis Bio Rad™, centrífuga, ultracentrífuga, espectrofotómetro, incubador con atmósfera controlada, campana de flujo laminar, máquina de revelado AGFA CP1000, películas fotográficas, filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ , placas de 96 pocillos.
- Medio de tampón fosfato (PBS) de pH 7,4, suero fetal bovino (FBS), antimicótico, antibiótico, tripsina, etanol, membrana de nitrocelulosa, Glicina, SDS, Tris, Acrilamida/Bisacrilamida 40%, TEMED, Persulfato, Azul de bromofenol, Glicerol, leche en polvo,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ECL, Tween 20, reactivo Bradford, BSA, anticuerpo antiCD63, anticuerpo antiratón.
- Línea celular PC3 de cáncer de próstata mantenida en la unidad de cultivos del Grupo de Neuroendocrinología Molecular del Departamento de Biología de Sistemas de la UAH.

Antes de empezar la manipulación se procede a la limpieza y desinfección de todo el material que se va a usar y de la superficie de la campana de flujo laminar con etanol al 70%. Durante la manipulación de los cultivos celulares se enciende la llama para desinfección de boquillas y tapones de los flask de cultivo y de todo el material que vaya a entrar en contacto con los cultivos celulares.

#### 4.2.2. CULTIVOS CELULARES.

Se ha realizado el cultivo de la línea celular PC3 correspondiente al estadio independiente de andrógenos de cáncer de próstata en el medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS), que aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo celular, y un 1% de antimicótico y antibiótico, para evitar la contaminación microbiana. Las células se mantienen a y en atmósfera de 95% de oxígeno y 5% de CO<sub>2</sub> en flask de cultivo.

Cada dos o tres días se procede a cambiar el medio de cultivo para retirar productos de desecho celular, evitando de este modo, efectos tóxicos sobre las células cultivadas, además de renovar las fuentes de nutrientes necesarios para el crecimiento celular.

Después de alcanzar un nivel de confluencia superior a 80% en la base del flask, correspondiente a una capa de células densamente poblada, se realiza una amplificación por pases de la población celular del flask. Se retira el medio de cultivo y se lava con una pequeña cantidad de tampón PBS para eliminar los restos del medio. Después, se procede a levantar las células añadiendo tripsina e incubando a 37°C, durante 2 a 3 minutos, para activar la hidrólisis de las proteínas de adhesión (un tiempo mayor puede provocar la lisis celular por acción de la tripsina) y se neutraliza con el doble de volumen de medio de cultivo. La solución obtenida se distribuye entre varios flask que se agitan para garantizar la distribución de células homogénea por la base del recipiente y se completa con medio de cultivo.

#### 4.2.3. AISLAMIENTO DE EXOSOMAS.

Para proceder con el aislamiento de los exosomas, es necesario incubar previamente los cultivos en un medio sin exosomas durante 72 horas para evitar la contaminación con los procedentes del suero FBS. El medio sin exosomas se

prepara mediante dos ultracentrifugaciones de medio completo a 25.000 rpm y 4°C, durante 6 horas, recogiendo el sobrenadante. Después de la incubación, con dicho medio, obtenemos un medio extracelular con exosomas de células PC3. Para aislarlos, se somete el medio a centrifugación a 1500 rpm y 4°C, durante 4 min, para precipitar las células presentes. A continuación, se recoge el sobrenadante y se vuelve a someter a una ultracentrifugación a 9.500 rpm, 4°C durante 25 min, para precipitar los cuerpos apoptóticos y restos celulares del medio. El sobrenadante obtenido se pasa a través de un filtro de 0,22 µm para eliminar las partículas de mayor diámetro del medio. Por último, se realiza otra ultracentrifugación a 25.000 rpm y 4°C durante 80 min para obtener un precipitado con los exosomas del medio. Como resultado, obtenemos un pellet de exosomas procedentes de células PC3 que se resuspende cuidadosamente con 50 µl del medio sin exosomas. La disolución final se conserva a -20°C hasta su uso posterior.

#### 4.2.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO BRADFORD.

En primer lugar, se realiza una curva patrón utilizando albumina sérica bovina (BSA) a 1 µg/ml como patrón que se diluye con agua destilada, preparando seis muestras con rango de concentración creciente, desde 0 µg/ml hasta 1 µg/ml, de BSA. Por otro lado, se realiza una dilución 1:5 de reactivo de Bradford, que contiene colorante azul Coomassie G-250 y se procede a la preparación de una placa de 96 pocillos para la realización de la curva de calibrado. Para ello, el análisis de cada muestra se realiza por triplicado con concentraciones conocidas de BSA; y por otro lado con la muestra de exosomas sin diluir y diluida 1:1 por duplicado. Se agita la placa para favorecer la reacción de coloración entre el reactivo de Bradford y las proteínas, obteniendo una coloración azul que corresponde a la presencia de proteínas, que se mide mediante la valoración de la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro a 595nm. Se utiliza para ello el lector Multiskan (Thermo Scientific) (**Tabla 1**).

Con las concentraciones conocidas y las absorbancias obtenidas de BSA se realiza una curva patrón, donde se interpolan los resultados de las muestras para calcular su concentración.

| Muestras                   | Columna 1               | Columna 2               | Columna 3               |
|----------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>A – 0 µg/ml BSA</b>     | 95 µl Bradford + 5 µl A | 95 µl Bradford + 5 µl A | 95 µl Bradford + 5 µl A |
| <b>B – 0,2 µg/ml BSA</b>   | 95 µl Bradford + 5 µl B | 95 µl Bradford + 5 µl B | 95 µl Bradford + 5 µl B |
| <b>C – 0,4 µg/ml BSA</b>   | 95 µl Bradford + 5 µl C | 95 µl Bradford + 5 µl C | 95 µl Bradford + 5 µl C |
| <b>D – 0,6 µg/ml BSA</b>   | 95 µl Bradford + 5 µl D | 95 µl Bradford + 5 µl D | 95 µl Bradford + 5 µl D |
| <b>E – 0,8 µg/ml BSA</b>   | 95 µl Bradford + 5 µl E | 95 µl Bradford + 5 µl E | 95 µl Bradford + 5 µl E |
| <b>F – 1 µg/ml BSA</b>     | 95 µl Bradford + 5 µl F | 95 µl Bradford + 5 µl F | 95 µl Bradford + 5 µl F |
| <b>G – M. exosomas</b>     | 95 µl Bradford + 5 µl D | 95 µl Bradford + 5 µl D |                         |
| <b>H – M. exosomas 1:1</b> | 95 µl Bradford + 5 µl G | 95 µl Bradford + 5 µl G |                         |

**Tabla 1.** Esquema detallado de la realización del ensayo de Bradford en una placa de 96 pocillos.

#### 4.2.5. “WESTERN BLOT”.

Antes de comenzar con la electroforesis, se procede a lisar el concentrado de exosomas con tampón de lisis: 20 mM Tris-HCl(pH=7,5), 1 mM EDTA, 0,5 M NaCl, 2mM PMSF y 5 µg/ml de inhibidores durante 30 min y 4°C. Tras la lisis se añade el tampón de carga y se somete a 95°C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas de los exosomas. Por otro lado, se preparan dos geles que se montan uno encima del otro para llevar a cabo la electroforesis:

##### 1. Gel de migración/separación de proteínas:

- Acrilamida / Bisacrilamida 40% a una concentración final de 10%.
- Tampón Lower 4X constituido por Tris 1,5 M pH=8,8, SDS 0,4% y agua csp. que gracias a su pH carga negativamente las proteínas favoreciendo su migración a través de este gel.
- Agua csp.
- Persulfato 100 mg/ml y TEMED para promover la gelificación de acrilamida.

##### 2. Gel de pre-concentración de proteínas:

- Acrilamida / Bisacrilamida 40% a una concentración final de 5%.
- Tampón Upper 4X 4°C constituido por Tris 0,5 M pH=6,8, SDS 0,4% y agua csp. que gracias a su pH mantiene las proteínas con carga neutra de manera que su velocidad de migración es muy baja y se acumulan en una banda al final del gel de concentración y al inicio del gel de migración.
- Agua csp.
- Persulfato 100 mg/ml y TEMED para promover la gelificación de acrilamida.

Una vez preparado el gel en el cassette del equipo de electroforesis se añaden las muestras, 30 y 50 µl del lisado de exosomas y el marcador de peso molecular. Se pone en marcha la electroforesis, a 110-130V en presencia de tampón de electroforesis compuesto por Tris 50 mM, Glicina 0,4 M, SDS 0,1%, Metanol 20% y agua csp., durante 1 hora.

Transcurrido este tiempo se realiza la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa, durante toda la noche a 25V y 4°C. De esta manera, las proteínas separadas en el gel se transfieren a la membrana de nitrocelulosa. A continuación, la membrana se incuba con el tampón de bloqueo (disolución de la leche en polvo en PBS y Tween 20) durante 1 hora para prevenir unión inespecífica de anticuerpos a la membrana.

El siguiente paso consiste en incubar la membrana con una dilución del anticuerpo CD63 1:100 en el tampón de bloqueo, durante toda la noche a 4°C. Transcurrido el tiempo se recoge la dilución del anticuerpo y se congela para su reutilización. A continuación, se lava la membrana 3 veces con PBS, para eliminar el exceso de anticuerpos.

Posteriormente se procede a incubar el anticuerpo secundario antiratón con una dilución 1:4000 en tampón de bloqueo diluido 5 veces durante 1 hora a temperatura ambiente. Se retiran el anticuerpo secundario y se lava 3 veces con PBS.

Por último, para revelar la presencia del anticuerpo secundario se pone en contacto la membrana con revelador constituido por ECL y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (en proporción 1:1000) durante 3 min. Se seca y se introduce en una cámara junto con una película fotográfica, que se revela en el equipo de revelado CP1000.

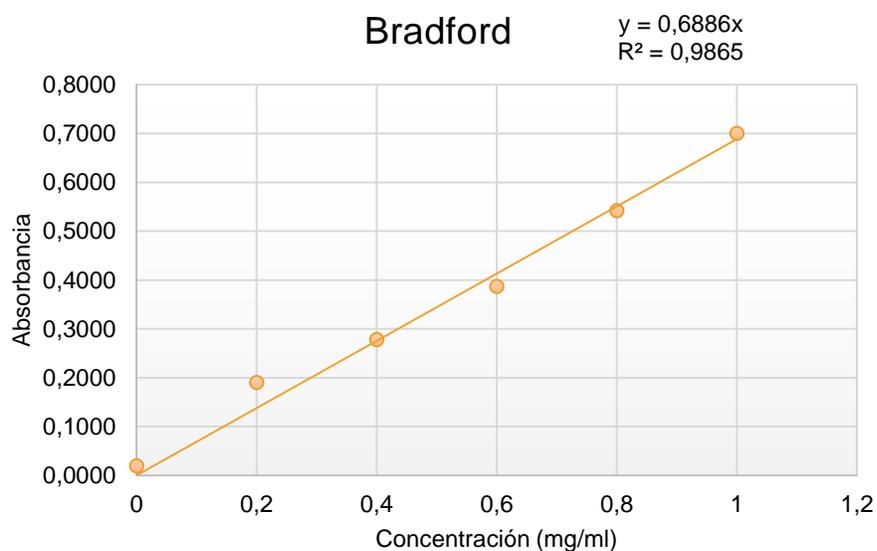
## **5. RESULTADOS.**

### **5.1. CULTIVO Y AISLAMIENTO DE EXOSOMAS.**

Para el aislamiento de exosomas, las células PC3 se han incubado en medio sin exosomas durante 3 días. Pasado ese tiempo se recoge el medio y se somete a ultracentrifugación para obtener un concentrado de exosomas que se conserva una vez disuelto a -20°C para posterior realización de los ensayos de Western Blotting y Bradford.

## 5.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD.

Tras la realización del ensayo de Bradford, se lleva a cabo la curva de calibrado correspondiente. Dicha curva presenta un coeficiente de correlación lineal ( $R^2$ ) superior a 0,90 por lo que se considera estadísticamente significativa y válida para la interpolación de la absorbancia de la muestra de exosomas procedentes de células PC3. Así la concentración final de proteínas obtenida en la muestra de exosomas es de 1,73 mg/ml que procede de un volumen de 50 ml correspondiente a  $8 \times 10^6$  de células.

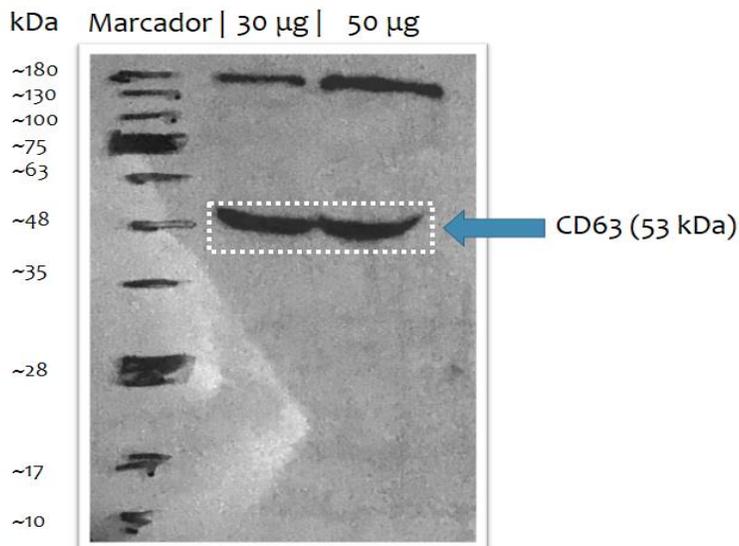


**Figura 4.** Curva de calibrado de albumina sérica bovina a 595nm para Bradford.

## 5.3. IDENTIFICACIÓN DE EXOSOMAS POR “WESTERN BLOT”.

Una vez cuantificada la cantidad de proteínas de la muestra de exosomas, pasamos a identificar la presencia de los mismos mediante anticuerpos específicos frente a la proteína CD63.

Después del revelado de la película fotográfica, previa electroforesis y transferencia de la muestra, se observa la presencia de una banda alrededor de 53 kDa correspondiente a la proteína CD63. Estos resultados confirman la presencia de exosomas en la muestra.



**Figura 5.** Identificación de la presencia de exosomas mediante un ensayo de “Western Blot” frente a la proteína CD63.

#### 5.4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE LA ENCAPSULACIÓN DE DOXORRUBICINA EN EXOSOMAS.

La doxorubicina (DOX) representa uno de los fármacos más utilizados en terapias anticancerígenas por su **amplio espectro de acción y eficacia** a pesar de ser uno de los más antiguos en el mercado. Fue descubierta en 1960 junto con la daunorrubicina mediante extracción a partir de la bacteria *Streptomyces paucetius* variante: *caei* representando las dos primeras moléculas de la familia de las Antraciclinas [20], que se siguen usando 50 años después.

Es un agente quimioterapéutico de amplio espectro que se aplica en cáncer de mama, de ovario, de útero, gástrico, de esófago, de hígado, del pulmón, de tiroides, hematológicos como linfoma Hodgkin y no Hodgkin, leucemia linfoblástica y mieloblástica aguda, mieloma múltiple, sarcoma y cánceres pediátricos (cáncer de Wilms por ejemplo) [20,4] demostrando una alta eficacia debido a su mecanismo de acción. El cual consiste por un lado en la interposición en el ADN y por otro, en **la inhibición de la enzima topoisomerasa II (TOP2)** de forma estable durante la apertura de la doble hélice de ADN impidiendo la replicación y reparación celular; dirigiendo de este modo su acción principalmente sobre células con alta actividad proliferativa como los tumores. Una de las consecuencias es que una vez

administrado, el fármaco se distribuye a tejidos sanos produciendo **efectos adversos importantes como mielosupresión o cardiotoxicidad**, acompañada de congestión cardiaca con una mortalidad de hasta el 50% [4], que han motivado un estudio más profundo de sus mecanismos de acción intracelular con el fin de establecer posibles estrategias para limitar su acción sobre las células cancerígenas o reducir alguno de los efectos adversos.

Vamos a detallar algunos de los mecanismos de acción conocidos de la doxorubicina desde el momento de introducción en la célula mediante difusión pasiva hasta su transporte al núcleo. Una vez en el espacio intracelular, la doxorubicina da lugar a estrés oxidativo mediante la formación de especies radicálicas de oxígeno (ROS) como  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  [20] que actúan a distintos niveles, dando lugar a la peroxidación de los lípidos, la alteración de la membrana plasmática e interfiriendo en la actividad de enzimas, proteínas y ácidos nucleicos. Según estudios recientes, su origen tiene lugar en los compartimentos mitocondriales donde la presencia de enzimas reductoras que junto al hierro favorecen la reducción de la doxorubicina en una semiquinona muy inestable. Esto da lugar a la formación de ROS que interfirieren en el correcto funcionamiento de la mitocondria [4,5], comprometiéndose la expresión de los genes mitocondriales y la actividad de la topoisomerasa 1 mitocondrial (TOP1mt) [12]. Por otro lado, la doxorubicina forma un complejo con los proteosomas del citoplasma que facilita su transporte hacia el núcleo [14] donde ejerce su acción principal. Sus efectos en el núcleo son la inhibición de la TOP2 $\alpha$  (característica de células proliferativas) y TOP2 $\beta$  (característica de células coalescentes) y la reducción de la expresión de genes; favoreciéndose así el efecto cardiotoxico [5] y el inicio de la apoptosis.

Hoy en día existen varias **estrategias de reducción de los efectos adversos** tóxicos que acompañan a los tratamientos con doxorubicina y antraciclinas. Una de estas estrategias se debe a que los efectos tóxicos están relacionados con una dosis acumulativa superior a 500 mg/m<sup>2</sup> de doxorubicina y por ello, se recomienda la administración de dosis inferiores [6]. Otra consiste en la administración de las dosis mediante infusión que ha demostrado disminuir la cardiotoxicidad frente a la administración repetida en bolos. Otra posibilidad es la sustitución por antraciclinas

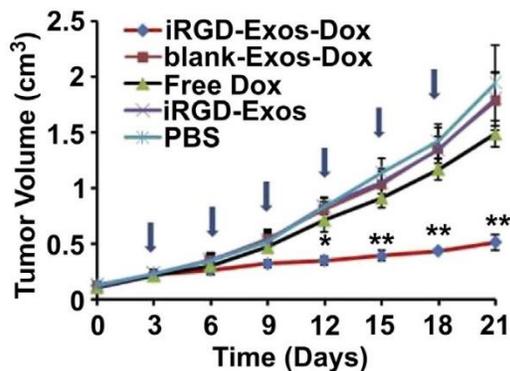
aunque la información disponible no aporta evidencias de una menor toxicidad en un rango de eficacia similar [6]. También es posible la coadministración preventiva de  $\beta$ -bloqueantes, IECAs o de Dexrazoxano que se une con TOP2 $\beta$  evitando su unión con la doxorubicina y reduciendo de este modo, los efectos tóxicos en células coalescentes como cardiomiocitos [24]. Otra estrategia que se considera muy prometedora y a la que se le ha dado mucha importancia en los últimos años es la **encapsulación de las moléculas de doxorubicina dentro de nanopartículas** para su transporte selectivo hacia las células diana reduciendo los efectos adversos y retrasando su eliminación del organismo.

La doxorubicina normalmente se administra en forma de sal de hidrocloreuro por vía intravenosa donde se une a las proteínas plasmáticas en un 74-76% y presenta un volumen de distribución entre 800 y 1200 l/m<sup>2</sup> lo que sugiere su **alta distribución por los tejidos reteniéndose en el organismo** hasta 24-48h (72h en leche materna) después de la administración [9]. Por otro lado, en el mercado está disponible una presentación de doxorubicina encapsulada en liposomas cuyas propiedades farmacocinéticas y de distribución son distintas sin afectar la eficacia del tratamiento. A veces pueden estar recubiertas con polietilenglicol (PEG) para protegerlo de eliminación por parte de los fagocitos y el sistema mononuclear. A diferencia de la doxorubicina convencional, los liposomas mantienen altas concentraciones del fármaco encapsulado en los vasos sanguíneos hasta 75 horas después de la administración, absorbiéndose sobre todo en vasos que presentan una mayor rigidez y mayor permeabilidad, característicos de los tejidos tumorales, que resulta en una disminución de la intensidad del efecto cardiotóxico [6,24,8].

También se está investigando la administración de doxorubicina encapsulada dentro de exosomas:

1. En uno de los estudios se han utilizado células DC inmaduras modificadas genéticamente para expresar la proteína Lamp2b fusionada con el péptido iRGD con afinidad por las  $\alpha$ V integrinas de los tejidos tumorales para generar exosomas con capacidad de transporte selectivo (iRGD-Exos) de doxorubicina a células tumorales. Los exosomas, una vez purificados, han sido cargados con doxorubicina mediante electroporación (iRGD-Exos-Dox) y se han realizado estudios *in vitro* con

líneas celulares MDA-MB-231, MCF-7, B16-F10 y HepG2 del cáncer de mama e *in vivo* en ratones con cáncer de mama MDA-MB-231 mediante inyección IV. Se ha observado que los exosomas modificados iRGD-Exos-Dox presentan una alta actividad citotóxica similar a la DOX libre *in vitro* y una mejor selectividad de acción acumulándose fundamentalmente en tejidos tumorales frente a exosomas naturales blank-Exos acumulados en hígado y bazo junto con una mayor eficacia del tratamiento con doxorubicina encapsulada en exosomas iRGD-Exos-Dox *in vivo* consiguiendo **reducir considerablemente el volumen** y velocidad de crecimiento del tumor frente a la doxorubicina libre sin presentar efectos tóxicos sobre el ratón (**Figura 6**) [21].

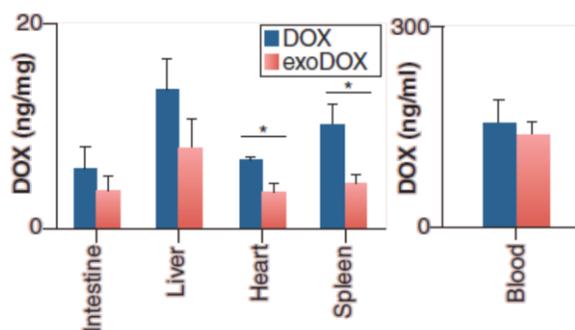


**Figura 6.** Evolucion del tamaño de tumor en ratón tratado con Dox. (Tomado de Tian y col., 2016; [21]).

2. Otro estudio ha utilizado los embriones de pez cebra (*Danio rerio*) elegidos debido a su similitud genética y biológica con los vertebrados superiores, facilidad de cuidado y rapidez de crecimiento para estudiar la capacidad de los exosomas de transportar medicamentos a través de la barrera hematoencefálica. Se han aislado exosomas procedentes de células de tumor neuroectodermal (PFSK-1), de endotelio cerebral (bEND.3), de glioblastoma (A-172) y de glioblastoma-astrocitoma neuronal (U-87) para estudiar su estructura y su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica mediante un estudio de fluorescencia posterior a la administración de exosomas cargados con rodamina 123 mediante incubación a 37°C. Solo los exosomas procedente de células bEND.3 han sido capaces de atravesar la barrera hematoencefálica que se diferencian de otros por su mayor contenido en receptor CD63 que puede sugerir el mecanismo de captura de los exosomas por endocitosis mediado por receptor. Después se han incubado la doxorubicina y el paclitaxel a 37°C en exosomas procedentes de células bEND.3 y se han administrado a los embriones de pez cebra con glioblastoma-astrocitoma neuronal mediante una inyección en la vena cardinal. Como consecuencia, se ha

detectado una disminución de la viabilidad celular que junto con la disminución de la presencia del factor proangiogénico VEGF **confirman la capacidad de los exosomas para transportar agentes quimioterapéuticos a través de la barrera hematoencefálica** [26].

3. Otro estudio más reciente investiga el efecto citotóxico de la encapsulación de doxorubicina en exosomas derivados de células cancerígenas, su perfil farmacocinético y los efectos adversos que produce. Para ello se han aislado exosomas de dos líneas celulares cancerígenas MDA-MB-231 y HCT-116 y se han cargado con doxorubicina mediante electroporación a 150V. Los exosomas obtenidos (exoDOX) se han administrado *in vitro* a cuatro líneas celulares cancerígenas MDA-MB-231, HCT-116, LoVo y DLD-1 demostrando una actividad citotóxica similar a la doxorubicina libre. Tras la administración *in vivo* a ratones con cáncer MDA-MB-231 a dosis pequeñas no tóxicas, el efecto citotóxico de ambos tratamientos es similar; mientras que a una dosis 10 veces mayor, el ratón tratado con DOX libre ha presentado, aparte de un debilidad general, una reducción de peso de 25% frente al 10% del ratón tratado con exoDOX y una **mayor acumulación en tejidos como hígado, bazo, intestino y llegando a un 40% superior en el corazón frente al tratamiento con exoDOX**, a pesar de mantener la concentración sanguínea a nivel similar (**Figura 7**) [22].



**Figura 7.** Distribución de la exoDOX frente a DOX libre en ratón. (Tomado de Toffoli y col., 2015; [22]).

## 6. CONCLUSIÓN.

En el presente trabajo se ha realizado una aproximación experimental del aislamiento y caracterización de los exosomas obtenidos de una línea de células tumorales prostáticas, PC3 y un estudio bibliográfico de los exosomas como vehículos biológicos de la doxorubicina.

Desde el momento de su descubrimiento los exosomas han generado mucho interés y los estudios que se han realizado han sido muy prometedores tanto en el campo terapéutico como en el diagnóstico como biomarcadores pero aun presentan varios problemas pendientes de resolver antes de poder utilizarse en clínica. Así la gran ventaja de los exosomas frente al resto de nanotransportadores es su origen endógeno, por lo que tienen una baja probabilidad de generar hipersensibilidad característica de los transportadores sintéticos. Por otro lado, los mecanismos de selección del contenido de los exosomas no se conocen todavía lo que impide mejorar el rendimiento de las técnicas de introducción de moléculas terapéuticas en su interior y evitar factores de riesgo ya que derivan, en algunos casos, de células tumorales o con otra patología. Por último, mientras que en animales de investigación su administración es muy eficaz, en seres humanos presenta una rápida eliminación del torrente sanguíneo [17], con una semivida aproximada de 5 min, con lo que su eficacia se ve comprometida y su uso en ensayos clínicos es limitado.

La parte experimental realizada en este trabajo ha implicado el manejo de cultivos celulares, aislamiento de exosomas por técnicas de ultracentrifugación, identificación por “Western Blot” y determinación de proteínas por el método Bradford, tal y como se indica en el apartado de material y métodos. El desarrollo temporal lento de algunas técnicas no ha posibilitado probar el efecto de estos exosomas sobre las propias células y comprobar si provocan en ellas cambios fenotípicos demostrando así el papel en la comunicación entre células de próstata.

Como las ideas principales del estudio bibliográfico indican, la doxorubicina es un agente quimioterapéutico de alta eficacia y un amplio espectro de acción. En la actualidad, existe un campo de investigación abierto para la mejora de su biodisponibilidad y evitar los efectos adversos de su tratamiento. La encapsulación de doxorubicina en los exosomas tiene prometedores ventajas como se demuestra en los ensayos “*in vitro*” e “*in vivo*”, pero no existen aún estudios clínicos aprobados<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> Según resultados de búsqueda en la base de datos de ensayos clínicos en línea [ClinicalTrials.gov](http://ClinicalTrials.gov) consultada el día 18/06/2016 utilizando como palabra clave “exosomes doxorubicin”.

## 7. BIBLIOGRAFÍA.

- [1] Aryani A, Denecke B. Exosomes as a Nanodelivery System: a Key to the Future of Neuromedicine? *Mol Neurobiol* 2016;53:818–34. Doi:10.1007/s12035-014-9054-5.
- [2] Batrakova E V., Kim MS. Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery. *J Control Release* 2015;219:396–405. Doi:10.1016/j.jconrel.2015.07.030.
- [3] Bell BM, Kirk ID, Hiltbrunner S, Gabrielsson S, Bultema JJ. Designer exosomes as next-generation cancer immunotherapy. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* 2016;12:163–9. Doi:10.1016/j.nano.2015.09.011.
- [4] Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, Correia S, Oliveira PJ, Santos MS y col., Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem* 2009;16:3267–85.
- [5] Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology* 2010;115:155–62. Doi:10.1159/000265166.
- [6] Cortés-Funes H, Coronado C. Role of anthracyclines in the era of targeted therapy. *Cardiovasc. Toxicol.*, vol. 7, 2007, p. 56–60. Doi:10.1007/s12012-007-0015-3.
- [7] Fernandez-Borja M, Wubbolts R, Calafat J, Janssen H, Divecha N, Dusseljee S y col., Multivesicular body morphogenesis requires phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Curr Biol* 1999;9:55–8. Doi:10.1016/S0960-9822(99)80048-7.
- [8] Ficha técnica CAELYX 2 mg/ml. Centro de Información online de Medicamentos de la AEMPS–CIMA [base de datos en Internet]. Madrid, España: Agencia española de medicamentos y productos sanitarios (AEMPS) - [fecha de acceso 30 de Junio de 2016]. Disponible en: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000089/WC500020180.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000089/WC500020180.pdf).
- [9] Ficha técnica FARMIBLASTINA 10 mg. Centro de Información online de Medicamentos de la AEMPS–CIMA [base de datos en Internet]. Madrid, España: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) - [fecha de acceso 30 de Junio de 2016]. Disponible en:

[http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/en/ft/51296/FT\\_51296.pdf](http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/en/ft/51296/FT_51296.pdf).

- [10] Gyorgy B, Hung ME, Breakefield XO, Leonard JN. Therapeutic applications of extracellular vesicles: clinical promise and open questions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2015;55:439–64. Doi:10.1146/annurev-pharmtox-010814-124630.
- [11] Johnsen KB, Gudbergsson JM, Skov MN, Pilgaard L, Moos T, Duroux M. A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles - Endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* 2014;1846:75–87. Doi:10.1016/j.bbcan.2014.04.005.
- [12] Khiati S, Rosa ID, Sourbier C, Ma X, Rao VA, Neckers LM y col., Mitochondrial topoisomerase i (Top1mt) is a novel limiting factor of doxorubicin cardiotoxicity. *Clin Cancer Res* 2014;20:4873–81. Doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-3373.
- [13] Manning AJ, Kuehn MJ. Functional advantages conferred by extracellular prokaryotic membrane vesicles. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2013;23:131–41. Doi:10.1159/000346548.
- [14] Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 2004;56:185–229. Doi:10.1124/pr.56.2.6.
- [15] Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* 2014;3:1–14. Doi:10.3402/jev.v3.24641.
- [16] Raimondo S, Naselli F, Fontana S, Monteleone F, Lo Dico A, Saieva L y col., Citrus limon-derived nanovesicles inhibit cancer cell proliferation and suppress CML xenograft growth by inducing TRAIL-mediated cell death. *Oncotarget* 2015;6:19514–27. Doi:10.18632/oncotarget.4004.
- [17] Saunderson SC, Dunn AC, Crocker PR, mclellan AD. CD169 mediates the capture of exosomes in spleen and lymph node. *Blood* 2014;123:208–16. Doi:10.1182/blood-2013-03-489732.
- [18] Tang X-J, Sun X-Y, Huang K-M, Zhang L, Yang Z-S, Zou D-D y col., Therapeutic potential of CAR-T cell-derived exosomes: a cell-free modality for targeted cancer therapy. *Oncotarget* 2015;6:44179–90. Doi:10.18632/oncotarget.6175.

- [19] Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 2006;Chapter 3:Unit 3.22. Doi:10.1002/0471143030.cb0322s30.
- [20] Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE y col., Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics* 2011;21:440–6. Doi:10.1097/FPC.0b013e32833ffb56.
- [21] Tian Y, Li S, Song J, Ji T, Zhu M, Anderson GJ y col., A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials* 2014;35:2383–90. Doi:10.1016/j.biomaterials.2013.11.083.
- [22] Toffoli G, Hadla M, Corona G, Caligiuri I, Palazzolo S, Semeraro S y col., Exosomal doxorubicin reduces the cardiac toxicity of doxorubicin. *Nanomedicine (Lond)* 2015;10:2963–71. Doi:10.2217/nnm.15.118.
- [23] Tran TH, Mattheolabakis G, Aldawsari H, Amiji M. Exosomes as nanocarriers for immunotherapy of cancer and inflammatory diseases. *Clin Immunol* 2015;160:46–58. Doi:10.1016/j.clim.2015.03.021.
- [24] Vejpongsa P, Yeh ETH. Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity: Challenges and opportunities. *J Am Coll Cardiol* 2014;64:938–45. Doi:10.1016/j.jacc.2014.06.1167.
- [25] Wang Q, Zhuang X, Mu J, Deng Z-B, Jiang H, Zhang L y col., Delivery of therapeutic agents by nanoparticles made of grapefruit-derived lipids. *Nat Commun* 2013;4:1867. Doi:10.1038/ncomms2886.
- [26] Yang T, Martin P, Fogarty B, Brown A, Schurman K, Phipps R y col., Exosome delivered anticancer drugs across the blood-brain barrier for brain cancer therapy in *Danio rerio*. *Pharm Res* 2015;32:2003–14. Doi:10.1007/s11095-014-1593-y.
- [27] Yang Y, Chen Y, Zhang F, Zhao Q, Zhong H. Increased anti-tumour activity by exosomes derived from doxorubicin-treated tumour cells via heat stress. *Int J Hyperthermia* 2015;31:498–506. Doi:10.3109/02656736.2015.1036384.